

## アシュラム試験法（畜産物）

### 1. 分析対象化合物

アシュラム

### 2. 適用食品

畜産物

### 3. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

### 4. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

アシュラム標準品 本品はアシュラム95%以上を含む。

### 5. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

試料10.0 gに水10 mLを加え、ホモジナイズした後、アセトン50 mLを加え、さらにホモジナイズする。毎分3,000回転で5分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にアセトン25 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離し、上澄液を採る。得られた上澄液を合わせ、アセトンを加えて正確に100 mLとする。この溶液から正確に5 mLを分取し、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に*n*-ヘキサン5 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル5 mLずつで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40°C以下で約1 mLまで濃縮する。

#### 2) 精製

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルカラム（500 mg）に0.1 mol/L塩酸10 mL及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液20 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）に0.1 mol/L塩酸10 mL及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液20 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルカラムの下部にオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを接続する。このカラムに1)で得られた溶液を注入した後、容器を0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液及び水（1：4）混液2 mLで洗い、洗液をカラムに注入する。さらに0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液7 mLを注入して、負荷液及び洗液を含む全溶出液を採り、0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液を加えて正確に10 mLとしたものを試験溶液とする。

### 6. 検量線の作成

アシュラム標準品の0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液の標準溶液を数点調製し、それぞれLC-MS/MSに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中0.01 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.0005 mg/Lである。

## 7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6. の検量線でアシュラムの含量を求める。

## 8. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

## 9. 測定条件

(例)

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径2.1 mm、長さ100 mm、粒子径5  $\mu\text{m}$

カラム温度：40°C

移動相：0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (49：1) から (7：3) までの濃度勾配を4分間で行い、さらに (1：49) までの濃度勾配を4分間で行い、(1：49) で3分間保持する。

イオン化モード：ESI (+)

主なイオン ( $m/z$ )：プリカーサーイオン 231、プロダクトイオン 156、92

注入量：5  $\mu\text{L}$

保持時間の目安：5分

## 10. 定量限界

0.01 mg/kg

## 11. 留意事項

### 1) 試験法の概要

アシュラムを試料からアセトンで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂する。エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムの下部にオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを連結したカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認する方法である。

### 2) 注意点

- ① アシュラムのLC-MS/MS測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。  
定量イオン ( $m/z$ )：プリカーサーイオン 231、プロダクトイオン 156  
定性イオン ( $m/z$ )：プリカーサーイオン 231、プロダクトイオン 92
- ② 濃縮後の残留物を溶解する際には、超音波処理を行い溶解するとよい。
- ③ アシュラムは食品成分とともに器壁に吸着しやすいため、アセトニトリル/ヘキサン分配後の抽出液の濃縮時は乾固しないほうがよい。
- ④ アセトニトリル/ヘキサン分配後の抽出液を濃縮後の残留物は、カラム精製における溶出溶媒である0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液には溶解が不十分なため、0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液及び水 (1：4) 混液で容器を洗い残留物を十分に溶かして、洗液をカラムに注入する操作を行う必要がある。
- ⑤ 試験法開発時に検討した食品：牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳

12. 参考文献

なし

13. 類型

C